

527345

1. 10. 2003

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. März 2004 (25.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/024948 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68,
G01N 33/22, 33/48, 21/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002836

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. August 2003 (20.08.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 44 057.3 10. September 2002 (10.09.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): RINA NETZWERK RNA-TECHNOLOGIEN
GMBH [DE/DE]; Takustrasse 3, 14195 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RIMMELE, Martina
[DE/DE]; Takustrasse 3, 14195 Berlin (DE). ORGEL,
Dagmar [DE/DE]; Takustrasse 3, 14195 Berlin (DE).

(74) Anwälte: JUNGBLUT, Bernhard usw.; Albrecht, Lücke
& Jungblut, Gelfertstrasse 56, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

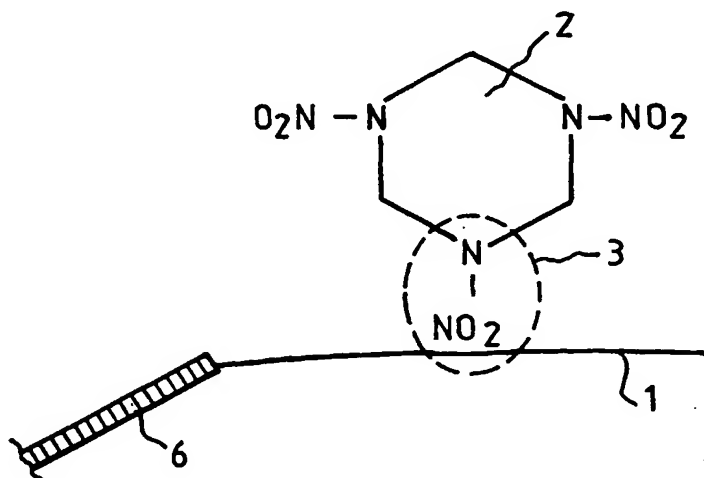
Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF AN ANALYSING SUBSTANCE FOR DETECTING AN EXPLOSIVE

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINER ANALYSENSUBSTANZ ZUR DETEKTION EINES EXPLOSIVSTOFFES



(57) Abstract: The invention relates to the use
of a nucleic acid (1) for detecting an explosive
(2). The nucleic acid (1) binds specifically
to the molecular substructure (3) or to the
molecular overall structure of the explosive
(2). A binding event is detected between the
molecular substructure (3) or the molecular
overall structure and the nucleic acid (1). The
invention also relates to nucleic acids (1) used
for said purposes and to a device used for said
purposes.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung
betrifft eine Verwendung einer Nukleinsäure
(1) zur Detektion eines Explosivstoffes (2),
wobei die Nukleinsäure (1) spezifisch an eine
molekulare Teilstruktur (3) oder molekulare
Gesamtstruktur des Explosivstoffes (2) bindet
und wobei ein Bindungsereignis zwischen
der molekularen Teilstruktur (3) oder der

molekularen Gesamtstruktur und der Nukleinsäure (1) detektiert wird. Nukleinsäuren (1) für solche Verwendungen und eine
Vorrichtung zur Ausübung der Verwendung.

WO 2004/024948 A1

Verwendung einer Analysensubstanz zur Detektion eines Explosivstoffes

Gebiet der Erfindung

5

Die Erfindung betrifft eine Verwendung einer Analysensubstanz zur Detektion eines Explosivstoffes, wobei die Analysensubstanz spezifisch zumindest an eine molekulare Teilstruktur des Explosivstoffes bindet und wobei ein
10 Bindungsereignis zwischen der molekularen Teilstruktur und der Analysesubstanz detektiert wird, sowie Analysensubstanzen für solche Verwendungen bzw. Verfahren.

Solche Analysensubstanzen können beispielsweise in der
15 Umweltanalytik, speziell der Luft-, Trinkwasser- und/oder Bodenanalytik, aber auch in anderen Bereichen der biochemischen Analytik sowie der medizinischen Diagnostik zum Nachweis von Explosionsstoffen bzw. deren chemischen Hauptkomponenten eingesetzt werden. Auch ist der Einsatz
20 im Rahmen von sicherheitstechnischen Maßnahmen möglich, beispielsweise zur Prüfung auf Anwesenheit von Sprengstoffen in Transportgütern, wie Fluggepäck und dergleichen.

Explosivstoffe im Sinne der DIN 20163 (Sept.1985) sind
25 solche explosionsfähigen Stoffe, die technisch als Sprengstoffe, Treib- und Schießstoffe, Zündmittel, Anzündstoffe oder pyrotechnische Erzeugnisse verwendet werden. Als Sprengstoffe werden lediglich beispielhaft organische Nitro-Verbindungen wie TNT (Trinitrotoluol),
30 Nitramine (Hexogen=RD_X=Hexahydro-1,3,5,-trinitro-1,3,5-striazin), Nitrosamine und Pikrinsäure genannt. Aber auch anorganische Substanzen, wie beispielsweise Bleiazid fallen hierunter.

Analysesubstanzen sind Substanzen, die in einem Analyseverfahren zur Bestimmung von Art und Menge eines Stoffes eingesetzt werden, wobei die Menge gebundener

5 Analysesubstanz direkt oder indirekt halbquantitativ oder quantitativ bestimmt und hieraus die Menge bzw. Konzentration an Explosivstoff ermittelt und angezeigt wird. Der Begriff der halbquantitativen Bestimmung umfaßt auch eine Information bezüglich des Über- oder Unterschreitens einer

10 definierten Grenzmenge gebundener Analysesubstanz und folglich einer hiermit korrelierten Grenzmenge bzw. Grenzkonzentration Explosivstoff (anwesend/abwesend im Falle einer Grenzmenge, welche durch die Detektionsempfindlichkeit bestimmt ist).

15

Ein Bindungsereignis kann jede Form einer (physiko-) chemischen Bindung/Wechselwirkung sein, z.B. ionische Bindung, kovalente Bindung, Van der Waals Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen.

20

Eine molekulare Teilstruktur kann eine funktionelle Gruppe, eine Kombination mehrerer funktioneller Gruppen, insbesondere benachbarter Gruppen, oder auch ein Kohlenstoffgerüst, mit oder ohne funktionellen Gruppen

25 sein. Bezeichnend hierbei ist, dass es sich um einen Ausschnittsbereich eines Moleküls oder einer Verbindung und nicht um das gesamte Molekül handelt. Entsprechendes gilt im Falle anorganischer Sprengstoffmoleküle.

30 Die Detektion eines Bindungsereignisses kann mittels optischer, chemischer, biologischer aber auch sonstiger physikalischer bzw. physikalisch-technischer Methoden erfolgen.

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik.

5 Explosivstoffe können einerseits aufgrund der Explosivei-
genschaften ein beachtliches Risiko darstellen. Beispiel-
weise in Sicherheitsbereichen, wie Flughäfen etc., müssen
Explosivstoffe detektiert werden, beispielsweise um uner-
wünschte Handlungen unter Verwendung der Explosivstoffe
10 durch Personen zu verhindern. Andererseits sind Explo-
sivstoffe meist zudem human- und/oder ökotoxisch und es
ist daher wünschenswert, auch geringste Mengen in Boden
oder Wasserproben, auch in Aerosolen, nachweisen zu kön-
nen, vorzugsweise einschließlich der Detektion des spezi-
15 fischen, vorgefundenen Explosivstofftyps. Letztes ist von
besonderer Bedeutung beispielsweise im Rahmen von Konver-
sionsmaßnahmen an stillgelegten militärischen Einrichtun-
gen. Schließlich ist es in der Forensik oft nötig,
Explosivstoffspuren nachzuweisen und den Explosivstofftyp
20 zu identifizieren.

Aus der Praxis sind verschiedenste klassische (nass-) chemische Analysenmethoden bekannt. Diese sind in der Anwendung aufwendig, benötigen ein Labor (on site Messungen
25 sind in aller Regel nicht möglich) und liefern keine schnellen Ergebnisse. Zudem befriedigen die erreichbaren Nachweisgrenzen nicht. Proben müssen vorher ggf. aufwändig aufkonzentriert werden, um die hohe Nachweisgrenze dieser Testsysteme unterschreiten zu können. Eine solche Aufk-
30 onzentrierung von Proben ist zusätzlich zeitaufwendig und kostenintensiv. Zudem weisen die insofern bekannten Testsysteme Kreuzempfindlichkeiten zu weiteren, in den Proben enthaltenen Stoffen auf.

Ein faseroptischer Biosensor zur Detektion von TNT basierend auf einem Immunoassay unter Verwendung einer fluoreszierenden Detektorverbindung, nämlich Antikörper, ist aus der Literaturstelle Craig, H. et al, Field Demonstration of On-Site Analytical Methods for TNT and RDX in Ground Water, Proceedings of the HSRC/WERC Joint Conference on the Environment, May 1996, bekannt. Damit ausführbare Verfahren erfassen Explosivstoffe quantitativ
10 allenfalls unzureichend; problematisch ist auch die Kreuzreaktivität von Antikörpern mit anderen Stoffen.

Des weiteren ist es aus der Praxis bekannt, zum Nachweis von Explosivstoffen Gas- oder Flüssigkeitschromatographie
15 anzuwenden. Hierfür notwendige Meßgeräte sind nicht on-site einsetzbar.

In einem fachfremden technologischen Gebiet ist ein Biosensor unter Verwendung eines immobilisierten, fluoreszenzmarkierten Aptamers zur Detektion von Thrombin beschrieben (Potyrailo, RA et al, Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors, Analytical Chemistry, 70, 3419-3425, 1998). Ein weiterer Biosensor zur Detektion von Thrombin ist in der Literaturstelle Lee,
20 M. et al, A Fiber-Optic Microarray Biosensor Using Aptamers as Receptors, Analytical Biochemistry, 282, 142-146, 2000 offenbart. Diese Literaturstelle beschreibt die Verwendung eines auf Mikroglaskugeln immobilisierten Aptamers zur Detektion von Thrombin.

30

Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein Verfahren zur Detektion von Explosivstoffen, mittels welchem Explosivstoffe mit verbesserter Empfindlichkeit und Spezifität nachgewiesen werden können und welches die Bestimmung von Explosivstoffen im Feldeinsatz ermöglicht, sowie Analysensubstanzen hierfür anzugeben.

Grundzüge der Erfindung

10

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure zur Detektion eines synthetischen Explosivstoffes, wobei die Nukleinsäure spezifisch an eine molekulare Teilstruktur oder die molekulare Gesamtstruktur des Explosivstoffes bindet und wobei ein Bindungsereignis zwischen der molekularen Teilstruktur oder der molekularen Gesamtstruktur und der Nukleinsäure detektiert wird.

20

Eine Nukleinsäure im Sinne der Erfindung kann als Nukleotidsequenz eine RNA, DNA oder eine PNA enthalten, welche auch derivatisierte nicht-natürliche Nukleotide aufweisen kann. Neben der Nukleotidsequenz kann eine Nukleinsäure aber auch Moleküle enthalten, beispielsweise endständig der Nukleotidsequenz gebunden, welche keine Nukleotide enthalten. Die Nukleinsäure kann insbesondere ein Aptamer sein. Ein Aptamer ist eine Nukleinsäure, welches analog einer Antikörper/Antigenaffinität ("Schlüssel/Schloss") oder gemäß dem Bindungsmodell des induced fit eine Bindungsaffinität zu bestimmten Zielstrukturen auf molekularer Ebene aufweist. Das Oligonukleotid kann auch ein Spiegelmer sein. Ein Spiegelmer ist eine spiegelbildliche, hochaffine Nukleotidsequenz, welche

30

aus L-Ribose bzw. L-2'-Desoxyribose Einheiten aufgebaut ist.

Mit der Erfindung wird gegenüber den klassischen Analysen-
5 methoden erreicht, dass eine extrem niedrige Nachweis-
grenze für die Detektion von Explosivstoffen erhalten und
damit die Empfindlichkeit des Testsystems zur Detektion
von Explosivstoffen erhöht wird. Ein der Messung vorge-
schalteter Anreicherungs-schritt zur Aufkonzentrierung der
10 Explosivstoffe ist aufgrund der hohen Nachweisempfin-
dlichkeit nicht notwendig und entfällt. Vorteilhaft
gegenüber der Antikörpertechnologie ist (neben der
besseren Empfindlichkeit und der on-site Anwendbarkeit),
daß Aptamere vollständig in vitro identifizierbar
15 (beispielsweise mittels theoretischer 3-dimensionaler
Strukturberechnungen) und herstellbar sind und folglich
keine Versuchstiere für Immunisierungszwecke benötigt wer-
den. Dennoch wird eine Spezifität erreicht, welche jenen
der Antikörpertechnologie zumindest ebenbürtig, gegenüber
20 der klassischen Analytik weit überlegen ist.

Die Erfindung lehrt weiterhin die in den Aus-
führungsbeispielen angegebenen Sequenzen für den Einsatz
in einem erfindungsgemäßen Verfahren.

25

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß Nukleinsäuren
nach Maßgabe ihrer Selektivität bzw. Affinität zu einem
Zielmolekül auffinden lassen. Dabei können sich gefundene
Nukleotidsequenzen um eine molekulare Teilstruktur, insbe-
30 sondere im Falle kleiner Zielmoleküle aber auch um eine
molekulare Gesamtstruktur gleichsam herumfalten, während
andere Nukleotidsequenzen diese Fähigkeit nicht oder in

nur vermindertem Maße aufweisen und im Rahmen eines Screenings verworfen werden.

5 Detaillierte Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen

Die molekulare Teilstruktur des Explosivstoffes kann unmittelbar an ein Stickstoffatom gebundenen disponiblen Sauerstoff tragen und aus der Gruppe bestehend aus "Nitrite, Nitrate, Nitro- und Nitrosoverbindungen" ausgewählt sein. Der Explosivstoff kann aus der Gruppe bestehend aus "Nitrobenzolderivate, TNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2-NT, Pikrinsäure, Hexogen, Octogen, Hexyl, Tetryl, Ethylenglykoldinitrat, Diethylenglykoldinitrat, Nitroglycerin, Nitropenta
10 sowie Derivate solcher Verbindungen" ausgewählt sein.
15

Die Nukleinsäure kann ausgewählt sein aus der Gruppe "Sequenzen der Figuren 8 und 9 oder beliebige Fragmente dieser Sequenzen, sofern diese Fragmente zumindest 6, 10 oder
20 15 fortlaufende Nukleotide aus einer solchen Sequenz aufweisen". Bevorzugt sind markierte (Unterstreichungen in Fig 8) Konsensussequenzen enthaltende Nukleinsäuren. Die Nukleinsäure kann direkt an einer Festkörperoberfläche, alternativ indirekt über eine Spacerverbindung an der
25 Festkörperoberfläche, immobilisiert sein. Eine Spacerverbindung ist ein Verbindungsmolekül zwischen einer Festkörperoberfläche und einer Nukleinsäure bzw. einem Aptamer. Die Spacerverbindung kann eine Linker-Nukleinsäure, beispielsweise ein kurzer synthetischer DNA-Doppelstrang,
30 sein; es sind aber auch beliebige andere langgestreckte organische Moleküle, typischerweise Oligomere oder Polymere, geeignet. Des weiteren ist auch Bindung über übliche Affinitätspaare, wie beispielsweise

Biotin/Streptavidin, möglich, wobei ein Molekül des Affinitätspaares mit der Nukleinsäure verbunden ist und das Komplementmolekül immobilisiert ist. Die Festkörperoberfläche kann im Rahmen einer optischen Fiber oder Faser
5 eingerichtet sein. Es versteht sich, dass auch mehrere verschiedene Nukleinsäurespezies auf der Oberfläche oder Faser immobilisiert sein können. In diesem Fall können verschiedene Explosivstofftypen, welche jeweils an die respektiven Nukleinsäurespezies spezifisch binden,
10 gleichzeitig detektiert werden.

Das Bindungsereignis kann durch Messung eines Signals eines (direkt oder indirekt) markierten und von einem Molekül des Explosivstoffes aus der Bindung mit der Nukleinsäure kompetitiv verdrängten Detektormoleküls detektiert werden. Insbesondere kommt eine Fluoreszenzmarkierung des Detektormoleküls in Frage. Eine Fluoreszenzmarkierung ist eine Markierung mit einem Fluorochrom. Ein Fluorochrom kann beispielsweise Fluorescein, Acridinorange oder andere gebräuchliche Fluorochrome, wie Cy5, Cy3, usw., sein. Das Signal kann durch Abnahme der Signalintensität gebundener Detektormoleküle oder durch Zunahme der Signalintensität freigesetzter (verdrängter) Detektormoleküle gebildet werden. Im Falle
25 von kooperativen Effekten, wie beispielsweise Stacking, kann auch eine Zunahme der Signalintensität gebundener Detektormoleküle erfolgen, oder beispielsweise durch FRET-Methoden. Im Falle des simultanen Einsatzes verschiedener Nukleinsäurespezies kann es sich empfehlen, für die
30 jeweiligen Nukleinsäurespezies verschieden markierte Detektormoleküle vorzusehen, damit zwischen Signalen von verschiedenen Nukleinsäurespezies diskriminiert werden kann.

Die Erfindung lehrt desweiteren eine Vorrichtung zur Detektion eines Explosivstoffes, wobei die Vorrichtung mit einer für eine molekulare Teilstruktur des Explosivstoffes spezifischen Nukleinsäure ausgestattet ist: Die Nukleinsäure kann direkt oder alternativ über eine Spacerverbindung an einer Festkörperoberfläche vorzugsweise einer optischen Faser oder Fiber immobilisiert sein. Bevorzugt ist, dass die Vorrichtung Mittel zur Detektion eines Bindungsereignisses zwischen der molekularen Teilstruktur und der Nukleinsäure beispielsweise einen Fluoreszenzdetektor aufweist. In der Vorrichtung kann eine Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung der Detektormoleküle eingerichtet sein, wobei die optische Faser oder Fiber an einen Fluoreszenzdetektor angeschlossen sein sollte. Desweiteren können Mittel zur Zuführung einer Probe zu der Nukleinsäure integriert sein. Im Falle der Detektion von Sprengstoffen im sicherheitstechnischen Bereich kann beispielsweise eine Luftprobe aus der Umgebung zu überprüfender Gegenstände entnommen und analysiert werden. Dabei kann die Luftprobe vor der Detektion zunächst in eine flüssige Phase eingebracht werden in welcher dann eine Detektion, wie beschrieben erfolgt. Es ist aber auch eine Detektion in der Gasphase möglich, wobei beispielsweise erfindungsgemäß eingesetzte Nukleinsäuren und/oder Detektormoleküle als Aerosol mit der Gasprobe kontaktiert werden können. Die Nukleinsäure kann mit einem fluoreszenzmarkierten Detektormolekül beladen sein, wobei die Bindungsstärke zwischen der Nukleinsäure und dem Detektormolekül niedriger als die Bindungsstärke zwischen der Nukleinsäure und der molekularen Teilstruktur sein sollte. Ein Teil der optischen Faser oder Fiber kann in einem Probengas- oder Flüssigkeitsraum, in welchen eine

Gas- oder Flüssigkeitsprobe einbringbar ist, angeordnet sein. Die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes liegt vorzugsweise in einem Bereich kleinerer Wellenlängen als die Wellenlänge des emittierten Lichtes des Markers.

5 Hierbei kann es sich um Wellenlängen des Fluoreszenzbereiches handeln. Der Lichteintrag kann über die optische Fiber oder Faser, über deren Manteloberfläche aber auch über eine oder beide Stirnflächen, erfolgen. Gleiches gilt für die Auskoppelung des emittierten Lichtes (Fluo-

10 reszenzsignal). Die optische Fiber oder Faser kann drehbar gelagert sein. Generell ist es selbstverständlich, daß emittiertes Licht nicht direkt detektiert wird, sondern indirekt über Emissionen von Molekülen, die ihrerseits durch das emittierte Licht angeregt werden. In dieser

15 Weise ist auch eine optische Verstärkung einrichtbar.

Es versteht sich, dass die Detektion der Verdrängung des Markers auch in anderer Weise, z.B. mittels eines elektrochemischen Sensors erfolgen kann. Auch kann die in direk-

20 ter Proportionalität zur Analytmenge stehende Konzentration des nichtgebundenen Markers mit einem beispielsweise elektro-enzymatischem Verstärkersystem quantifiziert werden. Hierdurch können erhöhte Empfindlichkeiten des Testsystems erreicht werden.

25

Ein mobiles Meßgerät auf Basis der Faseroptik kann mit einer tragbaren Stromquelle, z.B. einer Batterie, betrieben werden. Zur Aufzeichnung und Auswertung der Meßsignale kann das Meßgerät mit einem elektronischen Bauteil

30 beispielsweise einem Rechner ausgestattet sein und zur Förderung einer Gas- oder Flüssigkeitsprobe eine Fördereinrichtung, beispielsweise eine Schlauchpumpe, aufweisen.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich ein Ausführungsbeispiel darstellenden Figuren näher erläutert. Es zeigen:

5

Fig. 1: Anlagerung eines exemplarisch dargestellten Explosivstoffes an ein über eine Spacerverbindung immobilisiertes Aptamer

10

Fig. 2: ein über eine Spacerverbindung an eine optische Faser oder Fiber immobilisiertes Aptamer, beladen mit einem fluoreszenzmarkiertem Detektormolekül - vor Kontakt mit einer Explosivstoff haltigen Probe, im Dunkeln ohne Lichteinstrahlung.

15

Fig. 3: ein über eine Spacerverbindung an eine optische Faser oder Fiber immobilisiertes Aptamer, beladen mit einem fluoreszenzmarkiertem Detektormolekül - vor Kontakt mit einer Explosivstoff haltigen Probe, Lichteinstrahlung. Die optische Fiber oder Faser leitet das vom Fluorochrom emittierte Licht innerhalb der optischen Faser oder Fiber.

20

Fig. 4: ein über eine Spacerverbindung an eine optische Faser oder Fiber immobilisiertes Aptamer, beladen mit einem fluoreszenzmarkiertem Detektormolekül - nach Kontakt mit einer Explosivstoff haltigen Probe, im Dunkeln ohne Lichteinstrahlung. Der Explosivstoff hat einige Detektormoleküle verdrängt und ist am Aptamer gebunden.

25

30

Fig. 5: ein über eine Spacerverbindung an eine optische Faser oder Fiber immobilisiertes Aptamer, beladen

mit einem fluoreszenzmarkiertem Detektormolekül -
nach Kontakt mit einer Explosivstoff haltigen
Probe, Lichteinstrahlung. Der Explosivstoff hat
einige Detektormoleküle verdrängt und ist am Ap-
tamer gebunden. Die optische Fiber oder Faser
5 leitet das vom Fluorochrom emittierte Licht inner-
halb der optischen Faser oder Fiber. Die Emission
ist geringer als in Fig. 2, da weniger Fluoro-
chrome angeregt wurden.

10

Fig. 6: eine schematische Darstellung einer erfindungs-
gemäßen Vorrichtung

Fig. 7: Vergleichsversuche zur Bindungsstärke mit einem
15 Aptamer gegenüber einem Antikörper in einem
Immunverfahren

Fig. 8a bis 8h: erfindungsgemäße Aptamersequenzen

20 Fig. 9: erfindungsgemäße Konsensus-Sequenzen

In Figur 1 erkennt man eine Nukleinsäure 1 zur Detektion
eines synthetischen Explosivstoffes 2, wobei die Nuklein-
25 säure 1 spezifisch an eine molekulare Teilstruktur 3 des
Explosivstoffes 2 bindet. Es handelt sich bei dem Explo-
sivstoff 2 um TNT. Geeignete Nukleinsäuren 1 sind in den
Figuren 8 bis 9 dargestellt.

30 Die Figuren 2 bis 5 zeigen den Detektionsmechanismus für
Explosivstoffe. Die Nukleinsäure 1 ist über eine Spac-
erverbindung 6, an einer Festkörperoberfläche 7, beispiel-
sweise der Oberfläche einer optischen Fiber oder Faser 8,

immobilisiert. Figur 2 stellt die Beladung der Nukleinsäure 1 mit einem fluoreszenzmarkierten 4 Detektormolekül 5 und Figur 3 die Detektion eines Bindungsereignisses durch Messung eines Signals eines fluoreszenzmarkierten 4 5 Detektormoleküls 5 dar. Die Verdrängung des Detektormoleküls 5 aus der Bindung mit der Nukleinsäure 1 durch ein Molekül des Explosivstoffes 2 ist in Figur 4 dargestellt. In Figur 5 ist dargestellt, dass das Signal durch Abnahme der Signalintensität gebundener Detektormoleküle 5 gebildet wird.

In Figur 6 in Zusammenschau mit Figur 1 und 5 erkennt man eine Vorrichtung zur Detektion eines Explosivstoffes 2 mit einer für eine molekulare Teilstruktur 3 des Explosivstoffes 2 spezifischen Nukleinsäure 1. Die Nukleinsäure ist an einer Festkörperoberfläche 7 immobilisiert. Die Nukleinsäure 1 ist über eine Spacerverbindung 6 an einer optischen Faser 8 oder Fiber immobilisiert und mit einem fluoreszenzmarkierten 4 Detektormolekül 5 beladen. Es ist eine Lichtquelle 11 zur Fluoreszenzanregung der Detektormoleküle 5 eingerichtet, wobei die optische Faser 8 oder Fiber an einen Fluoreszenzdetektor 9 angeschlossen ist und ein Teil der optischen Faser 8 oder Fiber in einem Proben- gas- oder Flüssigkeitsraum 12, in welchen eine Gas- oder Flüssigkeitsprobe 13 einbringbar ist, angeordnet ist. Ein mobiles Meßgerät auf Basis der Faseroptik kann mit einer tragbaren Stromquelle 14, z.B. einer Autobatterie, betrieben werden. Zur Aufzeichnung und Auswertung der Meßwerte kann das Meßgerät mit einem elektronischen Bauteil beispielsweise einem Rechner 15 ausgestattet sein und zur Förderung der Gas- oder Flüssigkeitsprobe eine Fördereinrichtung 16 beispielsweise eine Schlauchpumpe aufweisen.

Zum Auffangen der Probe kann ein Auffangbehälter 17 eingerichtet sein.

In der Figur 7 sind Vergleichsversuche zur Bindungsstärke dargestellt. Es sind gezeigt Bindungsuntersuchungen TNT/erfindungsgemäße Nukleinsäure gegenüber TNT/Antikörper. Die Dissoziationskonstante der Aptamerreaktion liegt bei ca. $k_D = 10^{-8}$, jene der Antikörperreaktion bei lediglich ca. $k_D = 10^{-5}$.

10

Es ist gleichsam in Umkehrung der vorstehenden Verfahrensweise auch möglich, daß Sprengstoffmoleküle an der Festphase (z.B. in einer Durchflusszelle angeordnete Lichtleitfaser mit angeschlossenem Detektor für das von einem Fluorophoren auf Anregung mittels beispielsweise einer Leuchtdiode emittierten Lichtes) immobilisiert und mittels der markierten Nukleinsäure ein Signal erzeugt wird. Diese Umkehrung kann nicht nur einer eigentlichen Messung dienen (die an der Festphase gebundene Nukleinsäuremenge nimmt gleichgewichtsbedingt ab, wenn in der Flüssig- oder Gasphase Sprengstoffmoleküle anwesend sind), sondern es können auch Eichkurven erstellt werden oder Nukleinsäuren auf die erfindungsgemäße Eignung geprüft werden.

25

Erfindungsgemäße geeignete Nukleinsäure- bzw. Aptamersequenzen sind in Figur 8a bis 8h sowie in Figur 9 angegeben. Dabei sind markierte Bereiche (unterstrichene Teilsequenzen) bzw. Konsensusbereiche (jeweils einzeln für sich oder verbunden über eine beliebige Anzahl Nukleotide) jeweils von selbstständiger Bedeutung. Figur 9 zeigt Variationen der Aptamer-Konsensus-Sequenzen; es sind die in den Spalten angegebenen Austauschmöglichkeiten für

30

Nukleotide vorgesehen. Die vorstehenden Sequenzen sind auch in den Sequenzprotokollen wiedergegeben.

Generell können erfindungsgemäße Sequenzen bzw. Teilsequenzen jeweils als einzelne Moleküle oder einzeln innerhalb eines größeren Moleküls eingesetzt werden. Sie können aber auch beliebig miteinander im Rahmen eines einzelnen Moleküls kombiniert werden. Mittels verschiedener erfindungsgemäßer Sequenzen in einem (Nukleinsäure-) Molekül können verschiedene Explosivstoffe oder ein spezifischer Explosivstoff mit erhöhter Spezifität detektiert werden. Im ersten Fall sind die aneinandergesetzten Sequenzen für molekulare Teilstrukturen oder Gesamtstrukturen verschiedener Explosivstoff-Moleküle spezifisch. Im letzteren Fall sind die aneinandergesetzten Sequenzen für verschiedene molekulare Teilstrukturen eines einzigen Explosivstoff-Moleküls spezifisch ("bispezifisch" bzw. "multispezifisch"). Es ist aber auch möglich, dass gleiche erfindungsgemäße Sequenzen bzw. Teilsequenzen aneinandergesetzt werden, so daß ein einziges Nukleinsäuremolekül mehrere (gleiche) Explosivstoff-Moleküle binden kann. In jedem Falle kann es sich empfehlen, geeignete Spacersequenzen zwischen erfindungsgemäße Sequenzen bzw. Teilsequenzen zwischenschalten. Solche Spacersequenzen lassen sich insbesondere im Falle bispezifischer oder multispezifischer Nukleinsäuren beispielsweise im Wege des Molecular Modelling berechnen, wobei die hierfür notwendigen dreidimensionalen Bindungsinformationen zu den verschiedenen Sequenzen sich beispielsweise durch 3D Korrelations NMR (z.B. $^1\text{H}/^1\text{H}$ oder $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) erhalten lassen.

Patentansprüche:

1. Verwendung einer Nukleinsäure (1) zur Detektion eines Explosivstoffes (2), wobei die Nukleinsäure (1) spezifisch an eine molekulare Teilstruktur (3) oder an die molekulare Gesamtstruktur des Explosivstoffes (2) bindet und wobei ein Bindungsereignis zwischen der molekularen Teilstruktur (3) oder der molekularen Gesamtstruktur und der Nukleinsäure (1) detektiert wird.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die molekulare Teilstruktur (3) unmittelbar an ein Stickstoffatom oder an mehrere Stickstoffatome gebundenen disponiblen Sauerstoff trägt.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei die molekulare Teilstruktur (3) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Nitrite, Nitrate, Nitro- und Nitrosoverbindungen".
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Explosivstoff ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Nitrobenzolderivate, TNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2-NT, Pikrinsäure, Hexogen, Octogen, Hexyl, Tetryl, Ethylenglykoldinitrat, Diethylenglykoldinitrat, Nitroglycerin, Nitropenta sowie Derivate solcher Verbindungen".
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäure (1) ausgewählt ist aus der Gruppe

"Sequenzen der Figuren 8 und 9 oder beliebige Fragmente dieser Sequenzen mit einer Länge von zumindest 6, insbesondere zumindest 10, Nukleotiden".

5

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei ein Bindungsereignis durch Messung eines Signals eines markierten, insbesondere fluoreszenzmarkierten (4), und von einem Molekül des Explosivstoffes (2) aus der Bindung mit der Nukleinsäure (1) kompetitiv verdrängten Detektormoleküls (5) detektiert wird.

10

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Nukleinsäure (1), optional über eine Spacerverbindung (6), an einer Festkörperoberfläche (7), insbesondere die Oberfläche einer optischen Fiber oder Faser (8), immobilisiert ist.

15

20

8. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7, wobei das Signal durch Abnahme oder Zunahme der Signalintensität gebundener Detektormoleküle (5) gebildet ist.

25

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei das Signal durch Zunahme der Signalintensität freigesetzter Detektormoleküle (5) gebildet ist.

30

10. Nukleinsäure (1) zur Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 gemäß einer der Sequenzen der Figuren 8 oder 9 oder beliebige Fragmente dieser Sequenzen mit

einer Länge von zumindest 6, insbesondere zumindest 10, Nukleotiden.

- 5 11. Vorrichtung zur Detektion eines Explosivstoffes (2) mit einer für eine molekulare Teilstruktur (3) des Explosivstoffes (2) spezifischen Nukleinsäure (1), vorzugsweise an einer Festkörperoberfläche (7) immobilisiert, mit Mitteln zur Detektion eines
- 10 Bindungsereignisses (9) zwischen der molekularen Teilstruktur (3) und der Nukleinsäure (1) und mit Mitteln zur Zuführung einer Probe (10) zu der Nukleinsäure (1).
- 15 12. Vorrichtung nach Anspruch 11, wobei die Nukleinsäure (1) über eine Spacerverbindung (6) an einer optischen Faser (8) oder Fiber immobilisiert ist, wobei die Nukleinsäure (1) mit einem fluoreszenzmarkierten (4) Detektormolekül (5) beladen ist, wobei die
- 20 Bindungsstärke Nukleinsäure (1)/Detektormolekül (5) niedriger als die Bindungsstärke Nukleinsäure (1)/molekulare Teilstruktur (3) ist, wobei eine Lichtquelle (11) zur Fluoreszenzanregung der Detektormoleküle (5) eingerichtet ist, wobei die optische
- 25 Faser (8) oder Fiber an einen Fluoreszenzdetektor (9) angeschlossen ist und wobei zumindest ein Teil der optischen Faser (8) oder Fiber in einem Probegas- oder Flüssigkeitsraum (12), in welchen eine Gas- oder Flüssigkeitsprobe (13) einbringbar ist, angeordnet
- 30 ist.

FIG.1

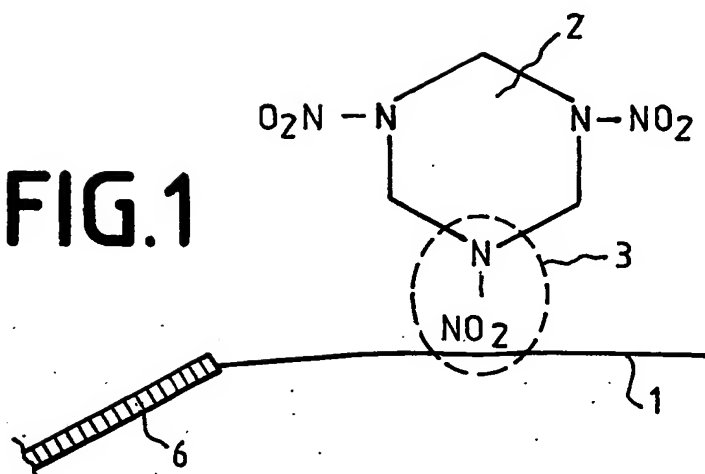


FIG.2

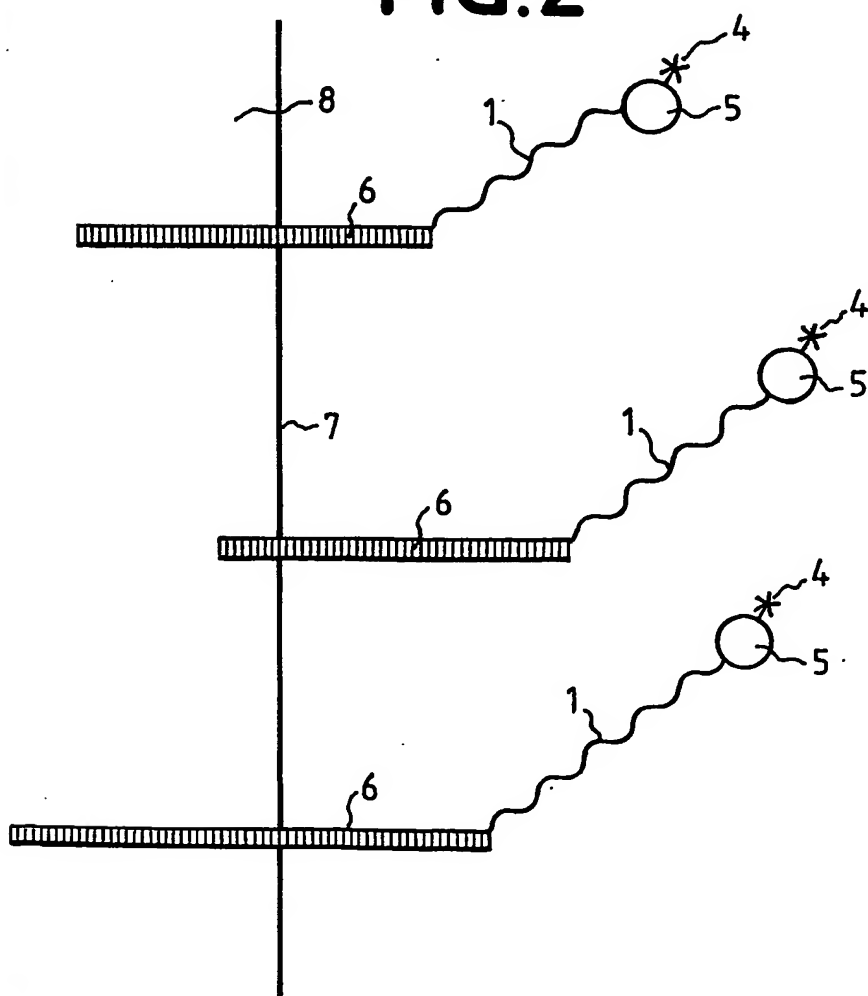


FIG. 3

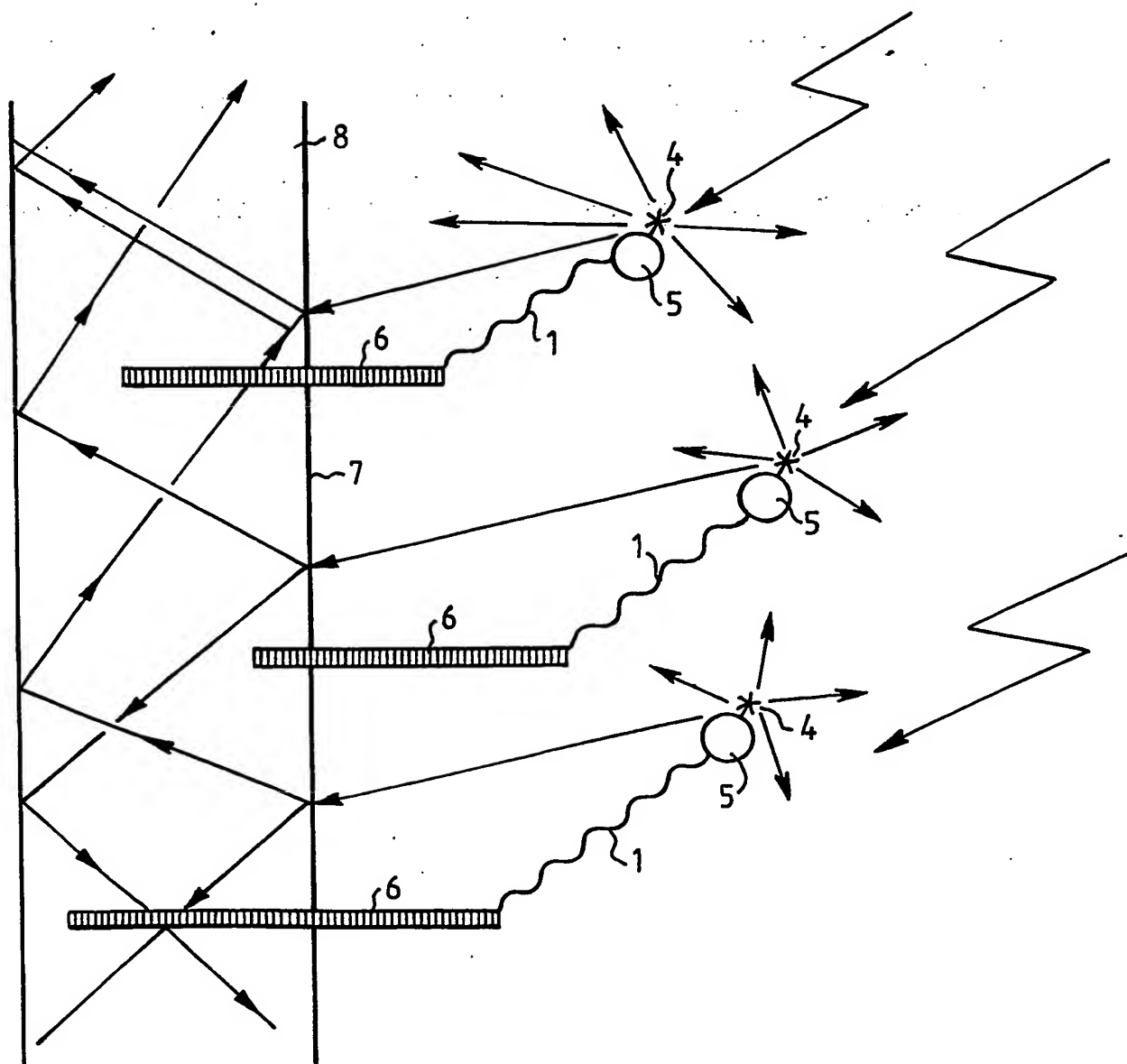


FIG.4

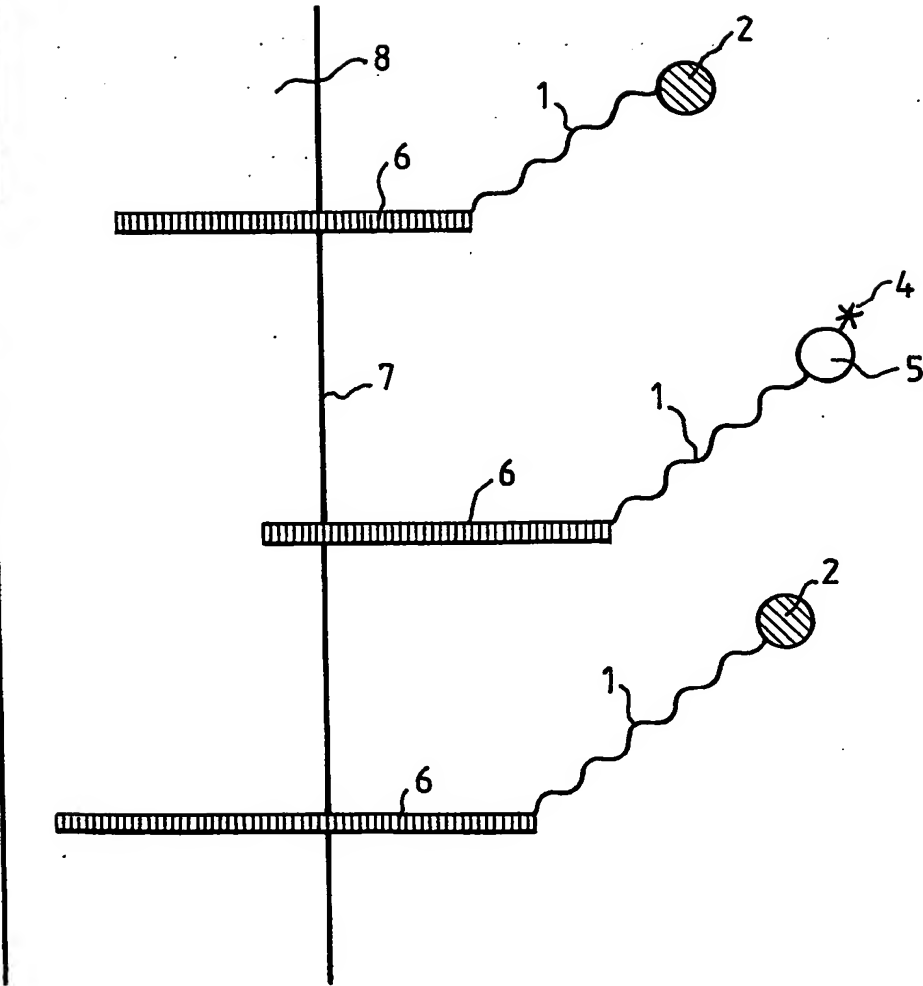


FIG.5

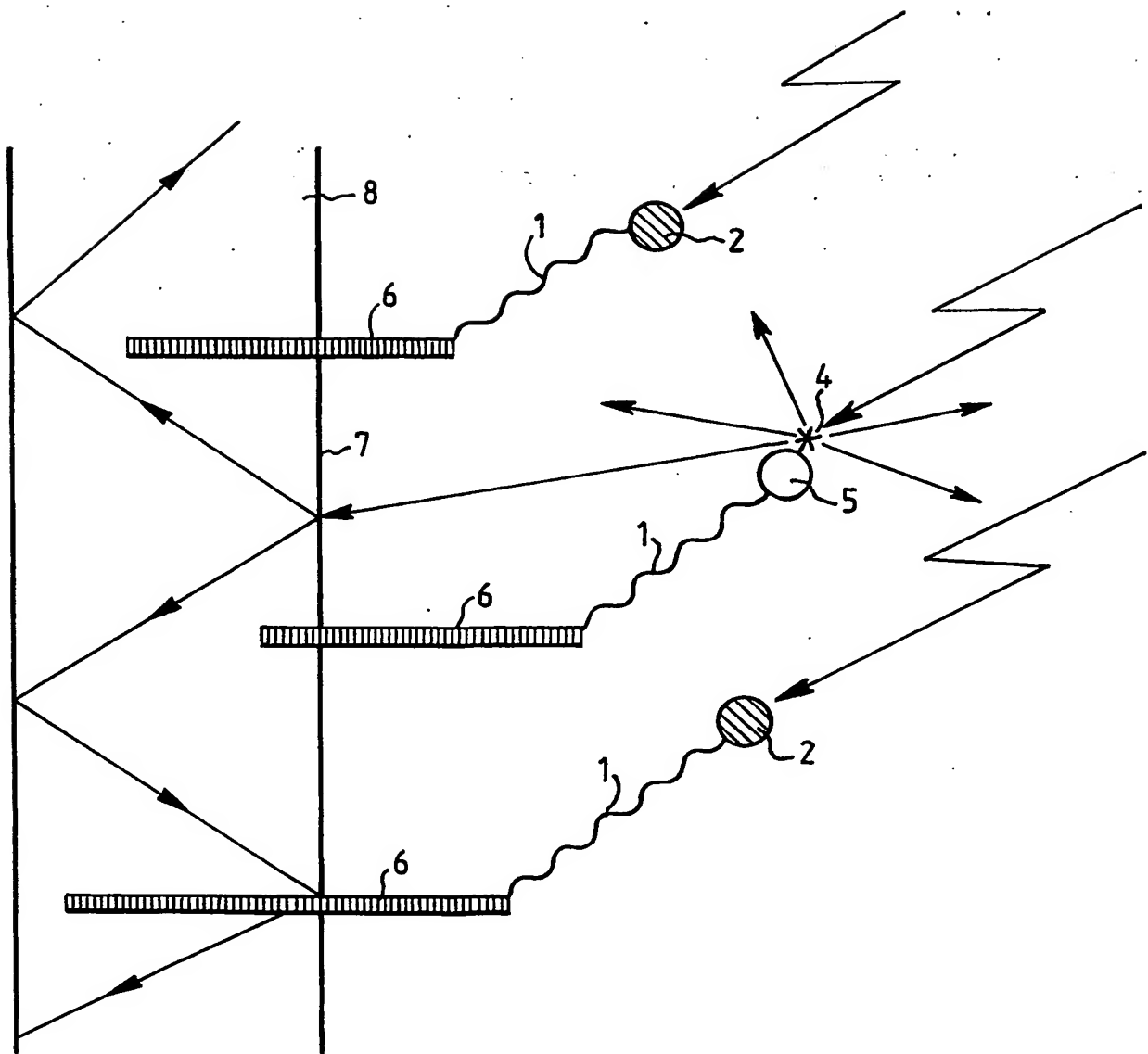


FIG.6

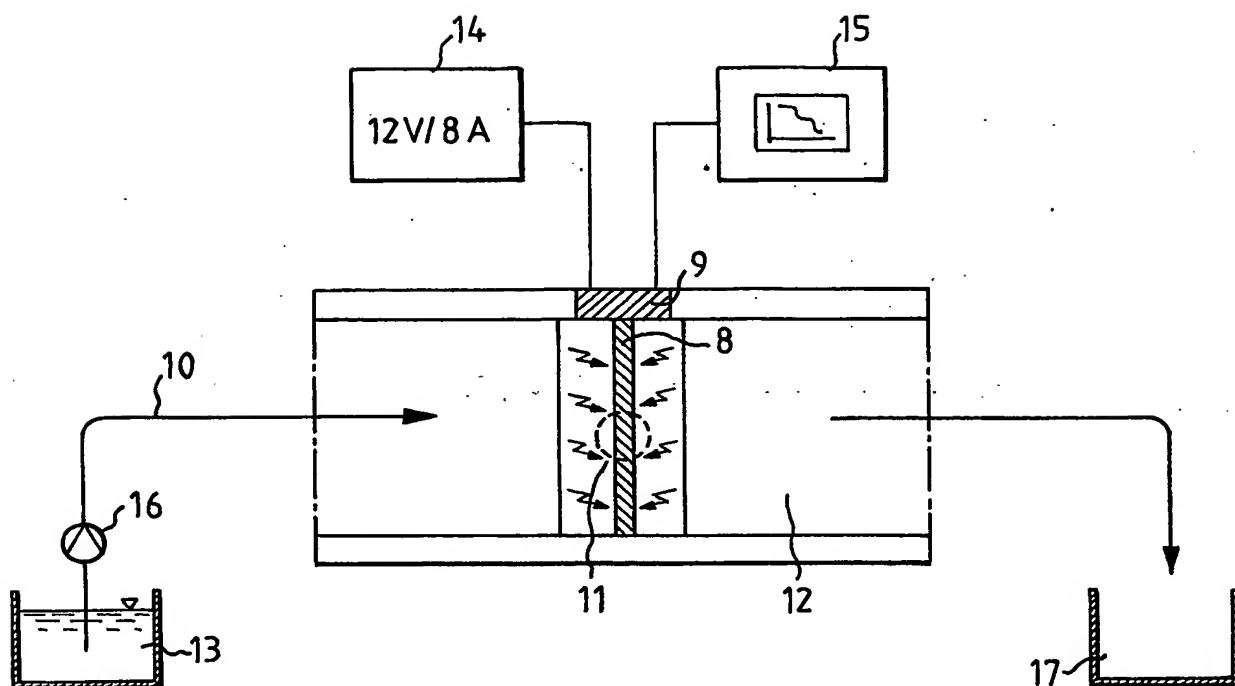
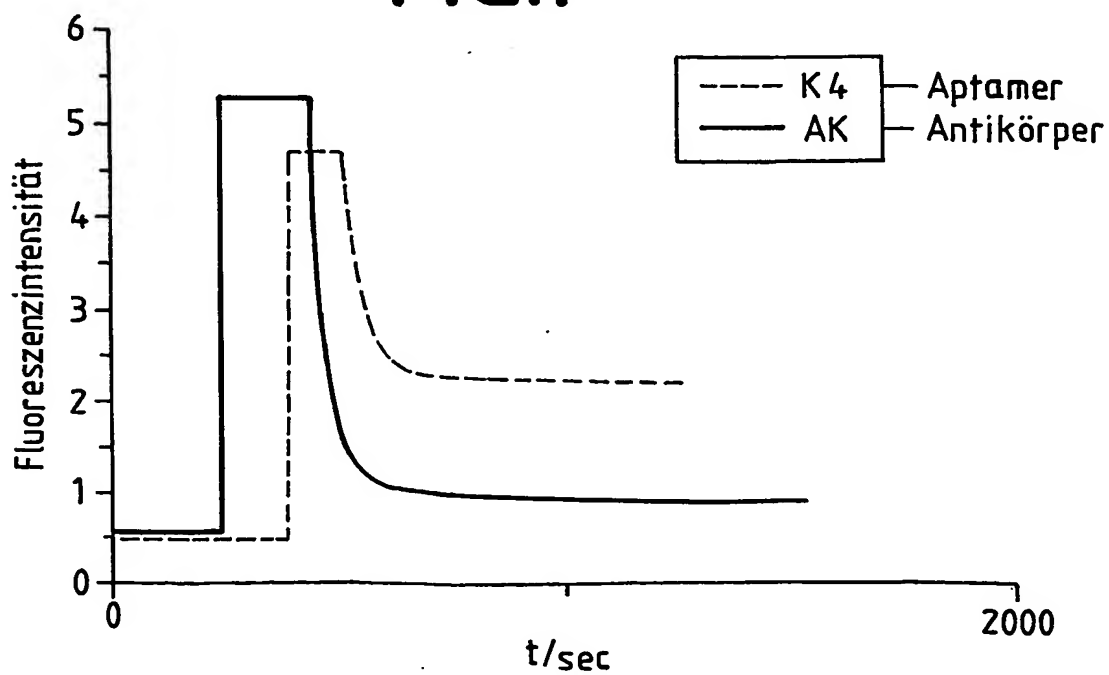


FIG.7



8515

④

*

 \wedge

Einzelne RNA-Klone

RNA

Primersequenzen

A GGGAAUUCGAGCUCGGUACC

D CUGCAGGCAUCCAGCUUGG

DO1-3 A

 \wedge

#

DO1-5

CUUAAUUGGGAAUCUGACACUACACACGGACCGACCGUCUAGUAGACCAUUUUCUAGGGGCUCCGACGUCCACGUGCGGCAUUUGUGCCCCC

DO1-6a

GUGUUGACCNCCUUUUACCCAGCCAUGLUCUAMUUGGUUUCUCCAGCGCCCUAUCUAGCGGAACUUCMCGGACGAUGGUGUGCGGCGUGGACCCCAUGCGGUC

DO1-7

UUAACACACAGUGGUAACACUAUUCUUCGGUACGUGCGCGCGCGUUAUUAAGGGGAGCAAGCGCGCUAACGGGAUGUCCCUACGCAUGACCGUGCAUUCACCG

DO1-8

UUGACGUUCUUUCCCGGACACUGGGACCGGUGUAGAAAGGUGAUCGGCUUAUACGCCCCCCAUCCGGACCC

FIG.8b

D01-10
 AUAACACAGUGGUAACUAUUCUGGUAACUGCGCCCCCGGCUUUAUACGGGAGCACGCCGGCUAACGGGAUGUCCCUACGCAUGAUCUGCAUUCACCG

D01-12
 AACGAAUUGAUCAGGAGCGCUUCGGCCUUCUGGCUAGAUAGCGCCCCCGGGUGUGUAAUAGACGGAGUACGCUUUAUACCGGGCCUUGUGAGCACACAC

D01-15
 CCACUGCCGAAUCCCCAAACAGCAUUGUUGUUGGGAAGCGCCCGACCCCGGCGUACGMAUUCGCAAGUUCGACUCUUGUAAUUC
 kompl.*

D01-17
 GUGAGUUUCCGAAUAGUUUGCUAGAGUGCCACGUAACGCGUACUCCGGGUGUAUCUUGCGAACCGGUGCGAAUUAACCGCAUGUUCUGAGUUCGCAAGUA

D01-18
 GCACGAGGGCUCUAUUAACGAGCAUUAUAGCGCACCGCGAUAGCGCGUACGAGGCAAGACUAAGGGUACUGUGGCUACAGCACUCUAUAGUUUGMAGGCG
 Inv.*

D01-19
 GGUUUGCUUUCGCCUUCGCGAAUUAACGAAACUAACCUUAAUAGGUGUCUUAACCGCAUCAAUUCGGAUCCCUUGUGGGUUCUCCUAGGAGCUC

D01-21
 AUAACACAGUGGUAACUAUUCUGGUAACUGGCGCCCCCGGCUUUAUACGGGAGCACGCCCGGCUAACGGGAUGUCCCUACGCAUUAUCUAGCAUUCACCG

D01-26
 UGCCGAUUAAGGCUAUAUUGCUGACGGCCAGGACACGGCUGGUGAAGUCAAUAUAGUAGCCAGCGUAGGGGCUUUCUCCAAUGCCCCCGAUGUAGCCUAGA
 Inv A

D01-27
 UGUGCCACAUUGCUUUGACGGCGACCCUGGACCCGCUUAUUAUCCGGCGCUUUAUAGCCGGACGGGGCGGUGGCAUAUUCUUAAGGGCCAUUACCC

D01-29
 UCGCGGACGCCUUGAGCGCAUCUACUUGACGUGGMAAGGCCAUUAUGUUGGCUUUAUGUAGCCCCCGUCCAGUAUUCUCCUUGAGAGCGGUG

FIG.8c

D01-30
 CUUGGUGGCYUCCGAMCCGAACUUGGGUUCACAGACCCAYUUAAGAMACACCCACGGGUGUCAYUGUGUUCUUCGAMUGCCCCACCGUCAYUACGGGUA
 ^

D01-32
 UGCACMUCGACGNGCMAAGAGAGGGCCCGAGAGACCCUAMAGAUUCUCUGGGCGAMCUGGUCUGAUUGMAUUAUUUGUAGGGCGGCGAGUGCGAMGUUG
 ☺ Inv ☺

D01-37
 CUAMAGGUUGGAAUUUGUGMACCCACCCGACACCAUUGGACAGUGGCUACAAAGUGUUCUCCACGCGACGCGNGNGCAGCGACGUGCGCGACCUCCUAUGGA

D01-40
 UACGCAUAMACCGUCGCGCCUGCGUCGUCUCCAYUACGGGCGGUUGGAYUUAUGUGCCGAGCACCCACMGGCUCACAUUGUUGAGCMAAAGCGUGGCCA
 ^ Inv. * ☺

D01-41
 UCGGCUAMACUCACCAUUAAGCGMAGCGGCGCGGUAGGMAUCCUAMUGCMCUUUUACGUUUGCCGGGUUCACCAUGMACGMACGUAGCUUCCCUAUGA

D01-47
 MACAGGAUUGAGCGMUCUACGUGUUCGCGUCGGAYUAGGUAUACUUUGMACCAUUGUACACUAGGAYUAGCAUGCGUCUAGCAUUGCGGCCCCUGGGG
 ^

D01-59
 AUUGCUGUACGGGAYUACGGUGMGCAGAAUGGUCACUGGUGCCUCCGACUGGACACAGUGCCAGUCCGGCGGUUGCUAUAGUAGGAGUGGGGUUAUAGU
 ☺

D01-61
 ACUCUCGCUUGCCUAGCAUUAUGGCUAAMAUUUUAMUCCGAGUACUAGGAGUCCGGCCUUAUUGGCAUUGMAUACUUUGCGCGAGUACACA

D02-1 ☺
 GACUUCGCCGACACGAGUGGUCACACGCGCUUAGUUAUAGUAGUACUUCUCCAUUAUAGGCUCCGGCGGUUCUACCCGCGAGGUCCUGAGUAGUAGCCGCC
 D02-2
 GUCUUAUUCUGGACACCAUAUUUGGACCCUCUUCAGUUGGAGUCCGAAACAGCCCCAAACCCCCGCAUGCGAGUCCAGUGGCUACCCGGGUACCCCCCA
 D02-3 Inv Δ
 GUUAAGCACCCUCGCUUCUACCGAUAGACUUGGCGACCGCAUACGAAUUAUUGCCCCUUAUUGGCCCGGACACAGCAUAGCANCUAAGG
 D02-5
 CCCUUGCGGGCCACUCGCGCUUUAACGAAUUAUUAUUGCACAUAUGUGGUAUACUUGGUAUCCCCCAUGCCCGUAGCAUAGUUGCGCUU
 D02-6I
 UAUUUGCAGUACCGAGCUAAUACCGGCAUUAUCGAGUUGACUCCGGGGCCAGCACUUAUUGCCUUCAAAGNUAGUUGACGAGAGUUGGUA
 D02-7 inv Δ
 CGCAACAAACUUAUCUGGUGGCUAGCAGUACGCCCCUACACAUUGAGCUGACCAACCCGACCUUAUAGGGGGGUGCGGGCGGAUCUACACGUAUCGGCGUGGA
 D02-8 Δ
 GGUCAGUAUCCGUGCGUACGGGGUUGCUCUCCUAGUAGGCUUGGCCACGUGUUAUUGGGAUUAUUAUAGGCCCAUUGUUGAGAAUUGGUGCCCCACUUAUAGC
 D02-9
 CAUCACUAUAGCAUCCUUGUACUUAUACAUAGCAACGGGUGGUAUUGCGGCUAGAAUACCCUCCGGGUGCCUACCAAAAGAUUAUUCCAAAACUGCA
 D02-10 Δ
 UCCACGUGGACCCCGCUAGCCCCCAGACGCCAGUAAUUCUUAUGCGACUUGCGCCUUGACACUUAUCAAAGNCAUUAUACGGCUUAUACCCACCGAGCC

④

AGCAGCUCGGGGCCCAACUCCGUWACUCACGCCCGAUCAGAGTGTAGTCCACAGUACUGAGACCUUCCUUGGGUGCGUACUCGUGGCUUAGTATATATCCGG

CUGUCGGUCACAUUGAUUCUGAGAAAAAAAAAAGGUGCNGGAGUAUCCGUGCUUGCCCGGCUAUGAACAUUUGGCAACUUCUGUGGGAGACUCCGCU

CCGUCCUAUCACCAAGAAUAGUAAGUUCUUAUCACCGAGACGACUAGAGUACUGGUUUUUCGGCUCAGUUUCCGGUUGACUCUAAAGG

G
U
A
G
C
A
C
A
U
G
U
C
A
U
G
U
C
C
C
U
A
U
G
U
A
G
U
C
C
G
G
C
G
C
A
U
G
C
C
C
U
A
G
G
U
A
C
C
C
U
U
C
G
G
C
A
U
G
C
C
G
A
U
G

ACCCACUCGGUACGUACCCUCCUUGCCCGCUUACGUACCCUGCCACACCCUUAUAGCUGACCGCCACUUCUGCGUACUGCGGAGGGCGCUUCA

ACUGUGCCAGAGACUUAUGUUAUCUGGCCGUAAGCCCCGGAUGCAGCAUACUACCCUACAGUUCUGGCCCGGACCGGUAAGGGUCC

CGCAUGCGCUCACCGCACUAGCAGCGGUGCGUGCGGACCGCCUUGCCMUUCCACCGGCACUCCGGUGUGUGCCGCGGCAACAC

UUGACGUUCUUAUCCCGAACAAAGUGGGACAGCGCGGUGUAGAAAGGUGAUCGGCGUAUAUACGGCGCCCAUCCGGGACCC

UUUAGCCACGGACGGAAUUAUUUGACCUACAUUCGGCAGGCCACGGACUUGGAGUUGCAGCUACAGCUAAUUUUAAGACGCUAAUUUGUGGGGGU

GUGAGUUUNCGAUUAGUUUGGUAGAGCCGCCAGCUACGGGUAUCUCCGGUACUCCGGAAUUUACCGC AUGUCUCUCUGAUGUUCGCACGUA

UCCAGCCCAAGCUCUAAUGUUUGACUUAAACCAAGACGGCGTAUGGCGACUCUAAUGCCCCCGACCCCAUAAUUUGCCCCCGUACUUAACCAAGUCGUUUUGCCCC

GGCAGCUUCGAAUUUUCGGAGGCCUAUUGUCUUAUUGUACCUUCUGUAAUACCCAGCGUUGUCGCCGAGACCCCCUUNAGCGAGUACCAACGCCCCUC

CUGGGCUAUUCCGMAUCCCUUUGUUCUACGGCCUCUUCGCCUGGUCAMUACCGGUGGAGCMAUUGCUGUAGUCAUCUUGCCGCC

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525

[illegible]

AAGCUUCCCAAGAGACUCAAUUAUUAUUCUGAUGCCAGUCACGCCAUCACUACCCUGUGACCGCGGAUCCGGCUUACCGCGAUUUUUUAAAGUUAAUUGG

FIG.8g

DQ3-Serie

ID03-3
AUMACACAGUGGUAGACUUAUUCUGGUACGUGCGCCCCCGGCGUUAUACGGGAGCACGCCGGCUACGGGAUGUCUCCUACGGCAUGUUCUGCAUUCACCG

ID03-7
AUMACACAGUGGUAGACUUAUUCUGGUACGUGCGCCCCCGG GUAUUAAGGGAGCACGCCGGCUACGGGAUGUCCUACGGCAUGACCGCAUUCACCG

Klon 2

D03-2
NCANNUCUNGCNCCUUAUAGNUUUAUCCAGCUCGGUACC UGCGCAUUAACGGCUAUAUUG CUGCAGGCAUGCAAGCUUGG

ID03-10
UGCGCAUUAACGGCUAUAUUG

D03-13
UGCGCAUUAACGGCUAUAUUG

Klon 8

D03-04
CGGGGAUCCUCUAGAUUCGAC

Klon 1

ID03-6
UCUGAUGCCUGCCGGUU

D03-16
CUNGACCGCUAGCCGGUU

Klon 3

D03-11
UUAACAGGGCCUACGACUUAUCUCCAUUAUGAGCGGGUAGACGUUAACGUAUGAGCUNUUAUUAUCCAGCAGCUCGACCUAGCGGGGGCCC

D03-14
UUAACAGGGCCUACGACUUAUCUCCAUUAUGAGCGGGUAGACGUUAACGUAUGAGCUNUUAUUAUCCAGCAGCUCGACCUAGCGGGGGCCC

FIG.8h

13/14

Klon 5

D03-15
UUUUGCGCCCUCCACGGGAUUGCUGUUUACAAUCUCUUAAGUGHCCMACUFIUHUUAUGHNGNGCHCACACHINNUGUGGGCAIUAAGGHICCCJUGNHCUUGUGCGCGUGNGCNCUNNG
D03-15
UUUUGCGCCCAUGCAACGGGAUUGCUNGUUUACAAUCUCUUAAGUGHCCMACUFIUHUUAUGHNGNGCNCACACGNGUGUGGGGANMAGGNIGCCCUUGHCUUGUGCGCGUGNGCGCUNGN

D03-17

HAUCCGAGMAGGAGGCUAUAUCACGCGCCIIAUGCUCAAUCUUAUUUGGCACGACAAUGCGCACGAGAUAGUAGCGMACUUCGAAUUCUAMCUGCUCGCCUCUC

Klon 6

D03-08
AUACACMAGUGGUAGACUAUUCUCUGGUACGUGCCCGCCCGGCGUAUUAACGGGAGCACGCCCGGCUAACGGAUGUCCCUACGCCUAUGAUUCUUAUCACCG

D03-12

AUACACMAGUGGUAGACUAUUCUCUGGUACGUGCCCGCCCGGCGUAUUAACGGGAGCACGCCCGGCUAACGGAUGUCCCUACGCCUAUGAUUCUUAUCACCG

D03-9

UCGAGUAAUACUCCCUUUGAUUUCUCCAGCACCCACAGUUUUGCAGACGGUCUUAUUGAUUCUUMGGGUUUGUCCAGGGUCCACCGACGCAUGUUCUGCUCUCCG

D03-18

GGCGUAGUAGCAUJGCCCCGACCCGACGGCCUCAAUCCGCMAGCGCUACGACCAUCCUUGCGCUUUGCGAGUGUCCGAGCGGUCAUUCCACCAAA

FIG.9

Konsensus Sequenzen

X ACUAUU X CUUC X GCGAAUUACGGG X GCUAAAUUGC X CAUGUG (U) GCU X
 CGCU C C G C CUG
 UG A
 A

X = 0 - n Nukleotide oder Spacermoleküle

nmax = 10, 20, 50, 100, 200, 500, oder 1000

X = gleich oder verschieden

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/03/02836

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 G01N33/22 G01N33/48 G01N21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE M ET AL: "A fibre-optic microarray biosensor using aptamers as receptors " ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 282, no. 1, 15 June 2000 (2000-06-15), pages 142-146, XP002240694 cited in the application the whole document	1-12
Y	JAYASENA S : "Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 45, no. 9, 1999, pages 1628-50, XP002271174 page 1638, paragraph 2 -page 1640, paragraph 1 page 1634, paragraph 2	1-12

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 2004

Date of mailing of the international search report

05/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	POTYRAILO R A ET AL: "ADAPTING SELECTED NUCLEIC ACID LIGANDS (APTAMERS) TO BIOSENSORS" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 70, no. 16, 15 August 1998 (1998-08-15), pages 3419-3425, XP000784025 ISSN: 0003-2700 the whole document	1-12
Y	SHRIVER-LAKE L C ET AL: "DETECTION OF TNT IN WATER USING AN EVANESCENT WAVE FIBER-OPTIC BIOSENSOR", ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, VOL. 67, NR. 14, PAGE(S) 2431-2435, 15-07-05 XP000519007 ISSN: 0003-2700 the whole document	1-12
Y	KLEINJUNG F ET AL: "HIGH-AFFINITY RNA AS A RECOGNITION ELEMENT IN A BIOSENSOR" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 70, no. 2, 15 January 1998 (1998-01-15), pages 328-331, XP000733213 ISSN: 0003-2700 the whole document	1-12
Y	BAKALTCHEVA I B ET AL: "A fiber optic biosensor for multianalyte detection: importance of preventing fluorophore aggregation" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 51, no. 1-3, 31 August 1998 (1998-08-31), pages 46-51, XP004153988 ISSN: 0925-4005 the whole document	1-12
Y	WO 00 11446 A (UNIV VIRGINIA ;MACARA IAN G (US); LANNIGAN DEBORAH A (US)) 2 March 2000 (2000-03-02) page 13, paragraph 3 -page 14, paragraph 1	1
Y	WO 00 70329 A (STEWART ALEXANDER ;UNIV BRANDEIS (US); STANTON MARTIN (US); WENSIN) 23 November 2000 (2000-11-23) page 26, paragraph 1	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/03/02836

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 199 16 417 A (SCHERING AG) 19 October 2000 (2000-10-19) SEQ ID NO 69 ist 100% identisch mit der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO 1 dieser Anmeldung ---	10
X	WO 95 06118 A (UNIV OKLAHOMA STATE ;MCEVER RODGER P (US); PAN JUNLIANG (US)) 2 March 1995 (1995-03-02) SEQ ID NO 2 dieser Anmeldung enthält die komplette Nukleinsäuresequenz die unter SEQ ID NO 9 beschrieben ist ---	10
A	YINON J: "Field detection and monitoring of explosives" TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, ANALYTICAL CHEMISTRY. CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 292-301, XP004371246 ISSN: 0165-9936 ---	
A	WO 01 86263 A (LE BINH Q ;LEW ARK L (US); LING SHARON X (US); STOTT DAVID D (US);) 15 November 2001 (2001-11-15). -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/03/02836

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0011446	A	02-03-2000	AU	5492499 A	14-03-2000
			WO	0011446 A2	02-03-2000
			US	6399302 B1	04-06-2002
WO 0070329	A	23-11-2000	AU	5012400 A	05-12-2000
			CA	2373314 A1	23-11-2000
			EP	1183521 A1	06-03-2002
			JP	2003508729 T	04-03-2003
			WO	0070329 A1	23-11-2000
			US	6680377 B1	20-01-2004
DE 19916417	A	19-10-2000	DE	19916417 A1	19-10-2000
WO 9506118	A	02-03-1995	US	5605821 A	25-02-1997
			AU	7671394 A	21-03-1995
			CA	2169941 A1	02-03-1995
			WO	9506118 A1	02-03-1995
WO 0186263	A	15-11-2001	AU	8463801 A	20-11-2001
			WO	0186263 A2	15-11-2001

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68 G01N33/22 G01N33/48 G01N21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	LEE M ET AL: "A fibre-optic microarray biosensor using aptamers as receptors" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 282, Nr. 1, 15. Juni 2000 (2000-06-15), Seiten 142-146, XP002240694 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-12
Y	JAYASENA S: "Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics" CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 45, Nr. 9, 1999, Seiten 1628-50, XP002271174 Seite 1638, Absatz 2 -Seite 1640, Absatz 1 Seite 1634, Absatz 2	1-12

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Februar 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05/03/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Osborne, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	POTYRAILO R A ET AL: "ADAPTING SELECTED NUCLEIC ACID LIGANDS (APTAMERS) TO BIOSENSORS" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, Bd. 70, Nr. 16, 15. August 1998 (1998-08-15), Seiten 3419-3425, XP000784025 ISSN: 0003-2700 das ganze Dokument	1-12
Y	SHRIVER-LAKE L C ET AL: "DETECTION OF TNT IN WATER USING AN EVANESCENT WAVE FIBER-OPTIC BIOSENSOR", ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, VOL. 67, NR. 14, PAGE(S) 2431-2435, 15-07-05 XP000519007 ISSN: 0003-2700 das ganze Dokument	1-12
Y	KLEINJUNG F ET AL: "HIGH-AFFINITY RNA AS A RECOGNITION ELEMENT IN A BIOSENSOR" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, Bd. 70, Nr. 2, 15. Januar 1998 (1998-01-15), Seiten 328-331, XP000733213 ISSN: 0003-2700 das ganze Dokument	1-12
Y	BAKALTCHEVA I B ET AL: "A fiber optic biosensor for multianalyte detection: importance of preventing fluorophore aggregation" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, Bd. 51, Nr. 1-3, 31. August 1998 (1998-08-31), Seiten 46-51, XP004153988 ISSN: 0925-4005 das ganze Dokument	1-12
Y	WO 00 11446 A (UNIV VIRGINIA ;MACARA IAN G (US); LANNIGAN DEBORAH A (US)) 2. März 2000 (2000-03-02) Seite 13, Absatz 3 -Seite 14, Absatz 1	1
Y	WO 00 70329 A (STEWART ALEXANDER ;UNIV BRANDEIS (US); STANTON MARTIN (US); WENSIN) 23. November 2000 (2000-11-23) Seite 26, Absatz 1	1

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 199 16 417 A (SCHERING AG) 19. Oktober 2000 (2000-10-19) SEQ ID NO 69 ist 100% identisch mit der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO 1 dieser Anmeldung	10
X	WO 95 06118 A (UNIV OKLAHOMA STATE ;MCEVER RODGER P (US); PAN JUNLIANG (US)) 2. März 1995 (1995-03-02) SEQ ID NO 2 dieser Anmeldung enthält die komplette Nukleinsäuresequenz die unter SEQ ID NO 9 beschrieben ist	10
A	YINON J: "Field detection and monitoring of explosives" TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, ANALYTICAL CHEMISTRY. CAMBRIDGE, GB, Bd. 21, Nr. 4, April 2002 (2002-04), Seiten 292-301, XP004371246 ISSN: 0165-9936	
A	WO 01 86263 A (LE BINH Q ;LEW ARK L (US); LING SHARON X (US); STOTT DAVID D (US);) 15. November 2001 (2001-11-15)	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/03/02836

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0011446	A	02-03-2000	AU	5492499 A	14-03-2000
			WO	0011446 A2	02-03-2000
			US	6399302 B1	04-06-2002
WO 0070329	A	23-11-2000	AU	5012400 A	05-12-2000
			CA	2373314 A1	23-11-2000
			EP	1183521 A1	06-03-2002
			JP	2003508729 T	04-03-2003
			WO	0070329 A1	23-11-2000
			US	6680377 B1	20-01-2004
DE 19916417	A	19-10-2000	DE	19916417 A1	19-10-2000
WO 9506118	A	02-03-1995	US	5605821 A	25-02-1997
			AU	7671394 A	21-03-1995
			CA	2169941 A1	02-03-1995
			WO	9506118 A1	02-03-1995
WO 0186263	A	15-11-2001	AU	8463801 A	20-11-2001
			WO	0186263 A2	15-11-2001